
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

Alimentation azotée d'une algue

LE « CYSTOCOCCUS HUMICOLA »

PAR LE D^r P.-G. CHARPENTIER

Au cours d'une étude sur le *Cystococcus humicola*, j'ai rencontré l'histoire de ses relations avec l'azote. Ces algues, qui se cultivent comme les microbes, sont des êtres un peu paradoxaux, végétaux supérieurs en ce qu'ils ont de la chlorophylle qui leur sert, végétaux inférieurs en ce qu'ils peuvent se passer de lumière, et vivre aux dépens d'éléments très complexes. Je voudrais dire ici, brièvement, ce que j'ai appris de leur relations avec l'azote.

Il est pour les végétaux, quatre sources possibles d'azote : l'air, les nitrates, les sels ammoniacaux et les matières organiques.

J'étudierai avec soin l'assimilation par le *Cystococcus* de l'azote libre, et plus succinctement celle des autres formes d'azote :

I

ASSIMILATION DE L'AZOTE LIBRE

Je ne résumerai même pas les nombreux travaux et les multiples discussions auxquelles a donné lieu la question de la fixation de l'azote par les végétaux, me contentant de rappeler qu'elle a été résolue par l'affirmative pour un certain nombre de microbes, et par la négative pour les plantes supérieures; en ce qui concerne les algues inférieures, elle reste encore en suspens.

Franck¹ admit un des premiers que certaines plantes vertes pouvaient prendre de l'azote à l'atmosphère, mais sans apporter de preuves convaincantes à l'appui de cette hypothèse.

MM. Schlöesing et Laurent², dans leur beau travail sur la fixation de l'azote par les légumineuses, ont observé que des sols

1. FRANCK, *Lehrb. der Bot.*, 1892.

2. SCHLÖESING ET LAURENT, *Ann. Inst. Past.*, 1892, p. 65.

qui se recouvrent de mousses et d'algues vertes inférieures peuvent fixer l'azote de l'air, tandis que des sols témoins, dans lesquels pareille végétation ne se fait pas, sont incapables d'effectuer une telle fixation; ils en ont conclu que certaines plantes vertes inférieures, notamment les algues, peuvent trouver dans l'atmosphère une partie de leur azote. Leur conclusion n'est pas à l'abri de toute critique, parce que leurs expériences n'ont pas été faites à l'abri des microbes du sol, dont on sait aujourd'hui que certains peuvent assimiler l'azote gazeux; rien ne prouve donc que dans un sol couvert d'algues et renfermant nécessairement de nombreuses bactéries, l'enrichissement en azote soit plutôt le fait des algues que des bactéries. Il faut de toute nécessité éviter la présence de ces dernières dans les cultures.

C'est ce qu'a fait M. Kossowitsch¹ dans des expériences dont il s'est autorisé pour conclure que le *cystococcus humicola* cultivé en culture pure, à l'abri de tout microbe, est incapable de fixer l'azote gazeux, ce qu'il fait au contraire très nettement quand il vit en symbiose avec certaines bactéries. Les chiffres obtenus par M. Kossowitsch, dans ses dosages d'azote, semblent probants; je vais cependant montrer que ses expériences ne sauraient entraîner la conviction et demandent à être refaites dans d'autres conditions; pour cela il me faut rappeler brièvement la manière dont il a opéré.

La culture était faite sur une couche mince de sable, arrosée avec la solution minérale suivante :

Phosphate bipotassique.....	0 ^{gr} ,25
— monopotassique.....	0 ^{gr} ,25
Sulfate de magnésium.....	0 ^{gr} ,37
Chlorure de sodium.....	0 ^{gr} ,2
Phosphate de fer.....	traces.
Sulfate de calcium.....	traces.
Eau.....	1000 grammes.

Chaque fiole contenait en outre 0^{gr},075 de glucose et, pour amorcer la culture, 2^{mg},5 d'azote sous forme de nitrate de potassium. Un lent courant d'air, dépouillé d'azote combiné par un barboteur à acide sulfurique, traversait la fiole. Au bout de plusieurs mois, l'azote total de la culture était dosé. Dans le cas où l'algue s'était seule développée en l'absence de tout microbe,

1. Kossowitsch, *Bot. Zeit.*, 1894.

M. Kossowitsch n'a jamais trouvé, à la fin de la culture, plus d'azote qu'il n'en avait mis au début; d'où la conclusion que le cystococcus n'assimile pas d'azote gazeux.

Or, M. Kossowitsch n'a jamais pesé ses récoltes, — la culture sur sable lui rendait la chose presque impossible — mais les rendements que j'ai obtenus dans de nombreuses cultures en milieu liquide glucosé¹ me permettent de supposer très légitimement que dans les conditions où il s'est placé, le poids de la récolte a dû être d'environ la moitié du poids de sucre disparu, soit 40 milligrammes; le cystococcus renfermant 5,14 0/0 de son poids d'azote (nombre obtenu dans un dosage par la méthode de Dumas), 40 milligrammes n'en contiennent pas tout à fait 2^{mgr},5; le milieu nutritif contenait donc tout l'azote nécessaire à la plante qui pouvait prendre naissance aux dépens du glucose : celle-ci n'avait par suite aucun besoin d'en chercher dans l'atmosphère. Une fois la totalité du sucre consommé, l'algue pouvait, il est vrai, se développer aux dépens de l'anhydride carbonique amené par le courant d'air, — j'ai constaté d'ailleurs combien est laborieuse sa multiplication dans ces conditions; — mais rien ne dit qu'elle puisse satisfaire à la fois au double travail de la synthèse de sa matière hydrocarbonée et de l'organisation de l'azote gazeux; tout ce que l'on sait sur la biologie des microbes fixateurs d'azote, le *Clostridium pasteurianum*, le *Microbe des nodosités des légumineuses*, par exemple, tendrait à faire croire que l'organisation de l'azote libre exige une très grande dépense d'énergie, qui ne peut être fournie que par la destruction d'une grande quantité de matière organique. Il se pourrait donc fort bien que le cystococcus ne soit capable d'assimiler l'azote gazeux que quand la dépense d'énergie pour l'assimilation du carbone est réduite au minimum, c'est-à-dire quand il trouve de la matière organique à brûler comme un microbe.

De plus, M. Kossowitsch, pour amorcer ses cultures, a employé l'azote nitrique; peut-être eût-il mieux fait d'avoir recours à une forme d'azote moins facilement assimilable, comme l'azote organique?

Toutes ces expériences ont donc besoin d'être reprises sur de nouvelles bases.

1. Ces expériences feront l'objet d'un mémoire qui va paraître incessamment sur l'assimilation du carbone par le cystococcus.

M. Bouilhac¹ a recherché si le *Nostoc punctiforme* pouvait prendre de l'azote à l'atmosphère; de ses expériences il a conclu que le nostoc, cultivé à l'état pur (c'est-à-dire sans autre espèce d'algue mélangée avec lui,) ne fixait pas d'azote libre, tandis qu'il le pouvait en présence de certaines espèces de bactéries. Or, c'est parce qu'il n'a pu obtenir aucun développement de l'algue dans un milieu dépourvu et de toute trace de carbone combiné et de toute trace d'azote combiné, qu'il a cru pouvoir formuler une pareille conclusion. Ce que j'ai dit des expériences de M. Kossowitsch montre qu'il en avait peu le droit.

MM. Dehérain et Demoussy² ont observé que des légumineuses peuvent se développer vigoureusement sans porter de nodosités sur leurs racines, mais seulement quand le sol se recouvre d'une couche d'algues vertes. Les microbes des nodosités n'ont évidemment pas fourni d'azote à la plante, mais rien ne dit que ce soit les algues plutôt que des bactéries qui aient pris dans l'atmosphère et mis dans le sol l'azote nécessaire aux légumineuses.

Les travaux qui ont trait à la fixation de l'azote libre par les algues se réduisent à ceux que j'ai indiqués. Un seul comporte une conclusion ferme, c'est celui de M. Kossowitsch, et nous avons vu que ses expériences, pêchant par certains côtés, demandaient à être refaites.

Voici comment j'ai opéré.

J'ai dit que la fixation de l'azote libre par le cystococcus exigeait probablement une très grande dépense d'énergie, que la plante ne peut se procurer que par la destruction d'une quantité considérable de matière organique; la combustion de cette matière organique ne peut s'effectuer sans la consommation de beaucoup d'oxygène; d'où la nécessité d'aérer les cultures le plus possible et par conséquent d'avoir recours à des milieux nutritifs solides. Une autre raison plaide d'ailleurs dans le même sens; en la circonstance, l'azote ne saurait être, sans un grave inconvénient, mesuré à la plante parcimonieusement; or la très faible solubilité de ce gaz dans l'eau fait qu'en vivant dans un milieu liquide, la plante n'en aurait guère à sa disposition.

Pour aider à la vie des premières cellules, il faut mettre un

1. BOUILHAC, *Ann. agron.*, t. XXIV, p. 579.

2. DEHÉRAIN et DEMOUSSY, *Ann. agron.*, t. XXVI, p. 169.

peu d'azote dans le milieu de culture. J'ai, dans ce but, fait choix, pour substratum nutritif, de bouillon de haricots glucosé et gélosé, après m'être assuré que la plante s'y développait fort bien ; c'est, je le rappelle, le milieu sur lequel M. Mazé¹ a cultivé la bactérie des nodosités des légumineuses. 150 grammes de haricots sont portés à l'ébullition dans un litre d'eau ; au liquide filtré j'ajoute 1 0/0 de glucose et 1,5 0/0 de gélose ; le mélange chauffé à 120°, puis filtré, est réparti dans les vases de culture et stérilisé à 115°. Ces vases sont des grands matras à fond plat et à tubulure latérale, connus sous le nom de ballons à toxine, dans lesquels on peut faire passer un courant d'air entrant par la tubulure supérieure et sortant par la tubulure latérale ; chaque matras contenait 100 c. c. de gélose nutritive, qui, vu la très grande surface du fond, formait une couche extrêmement mince.

L'air, qui arrivait sur la culture, devait évidemment être dépourvu de toute trace d'azote combiné ; à cet effet, il traversait un très long tampon de coton pour se débarrasser des parcelles de nitrates solides, qui pouvaient se trouver dans l'air du laboratoire ; il passait ensuite dans un barboteur à potasse concentrée qui retenait les vapeurs nitreuses, puis dans un flacon laveur à acide sulfurique, auquel il abandonnait son ammoniaque, enfin, dans un flacon laveur contenant de l'eau, qui le saturait d'humidité ; cette eau pouvait en outre retenir les traces de vapeurs nitreuses qui ne se seraient pas combinées à la potasse.

L'expérience étant disposée comme je viens de le dire, les ballons sont ensemencés, puis exposés à la lumière diffuse à une température oscillant entre 12° la nuit et 28° le jour.

La culture se fait bien ; au bout de 20 jours on dose l'azote total dans les ballons de culture et dans des ballons témoins, contenant la même quantité de la même gélose, mais n'ayant pas été ensemencés.

Chaque ballon reçoit 25 c. c. d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 5 0/0, puis est chauffé à 120° pendant 1/4 d'heure ; la gélose est saccharifiée et les traces d'ammoniaque qu'elle peut contenir se sont combinées à l'acide. Le liquide de chaque ballon est alors soigneusement introduit dans un ballon à atta-

1. MAZÉ, *Ann. Inst. Past.*, 1897, p. 45.

que de Kjeldahl; il y est concentré par distillation à basse température, sous pression réduite, dans un courant d'air sec (la dessiccation de cet air est effectuée par le chlorure de calcium et l'acide sulfurique; le courant d'air ne peut ainsi amener aucune trace d'ammoniaque dans le ballon). La distillation est continuée jusqu'à ce que le contenu du ballon soit devenu absolument pâteux.

Ceci fait, l'azote est dosé par la méthode de Kjeldahl.

Voici les résultats obtenus dans une expérience :

Azote au début de la culture.....	18 ^{mgr} ,9
— à la fin —	18 ^{mgr} ,6

La différence des 2 nombres est de l'ordre des erreurs d'expérience, on peut donc affirmer que le développement de la plante n'a amené aucun changement dans la teneur en azote du milieu.

Cependant pour que la plante ait à coup sûr un excès de glucose à sa disposition, l'expérience a été recommencée, chaque ballon contenant alors 2 fois plus de sucre, soit 2 0/0; le résultat a été le suivant :

Azote au début de la culture.....	20 ^{mgr} ,2
— à la fin —	20 ^{mgr} ,0

Il n'y a donc pas eu fixation d'azote libre pendant la durée de la culture.

Le cystococcus est incapable, même dans les conditions les plus favorables, de prendre une partie de son azote dans l'atmosphère.

II

ASSIMILATION DE L'AZOTE NITRIQUE

Je serai bref sur l'assimilation des nitrates par le cystococcus, parce que son étude ne permet de résoudre aucune question d'ordre général.

Depuis les travaux de Boussingault¹ et de Georges Ville², on sait combien l'azote nitrique est facilement assimilé par les végétaux à chlorophylle et combien il aide à leur développe-

1. BOUSSINGAULT, *Ann. de Chim. et de Phys.*, 3^e série, t. XLVI, p. 5.

2. GEORGES VILLE, *Ann. de Chim. et de Phys.*, 3^e série, t. XLVI, p. 214.

ment; malheureusement, on ne sait presque rien sur le mécanisme de cette assimilation. Le seul fait qui semble établi d'une manière à peu près indiscutable, par les travaux de Schloësing¹, Laurent, Marchal et Carpiaux², c'est que les nitrates peuvent, dans les tissus végétaux, être réduits en ammoniacque; je dis « peuvent être réduits », parce que rien ne prouve que la totalité de l'azote nitrique doive subir cette transformation pour être assimilée.

La lumière paraît jouer un rôle important dans cette réduction, ainsi que le fit remarquer le premier M. Pagnoul³; mais tandis que les uns, comme MM. Laurent, Marchal et Carpiaux, admettent que cette réaction puisse se faire à l'obscurité, en niant toutefois avec Godlewsky⁴ que dans ces conditions l'ammoniacque puisse s'organiser, les autres, comme Mazé⁵, regardent les deux choses comme également possibles.

Le cystococcus peut prendre son azote aux nitrates.

Voici qui le prouve : Faisons la solution nutritive suivante :

Sulfate de magnésium.....	1 gramme.
Phosphate bipotassique.....	2 grammes.
Nitrate de potassium.....	2 —
Nitrate de calcium.....	0 ^{sr} ,05
Sulfate ferreux.....	traces
Glucose.....	10 grammes.
Eau.....	1000 —

Après chauffage à 120°, filtration et stérilisation à 120°, ensemençons-la; après 13 jours de séjour à l'étuve, nous pourrions recueillir 396 milligrammes de plante sèche, renfermant 20^{mgr},3 d'azote, qui ne peuvent provenir que des nitrates introduits dans le milieu.

Si les nitrates sont réduits par l'algue, ils peuvent l'être, soit à l'intérieur des cellules, soit à l'extérieur; il n'y a aucun moyen de s'en assurer dans le premier cas; dans le second, au contraire, on peut le faire en cherchant l'ammoniacque dans le liquide de culture. C'est ce que j'ai fait.

Cette ammoniacque n'est certainement pas à l'état de liberté; un liquide maintenu à l'air libre en couche mince ne saurait

1. SCHLOESING, *C. R.*, t. CXXXI, p. 716.

2. LAURENT, MARCHAL et CARPIAUX, *Bull. de l'Acad. roy. des Sc. de Belg.*, 3^e série, 1896, t. XXXII, p. 815.

3. PAGNOUL, *Ann. agron.*, 1879, t. V, p. 486.

4. GODLEWSKY, *Anzeig. der Akad. Wiss. in Krakau*, 1897, mars.

5. MAZÉ, *C. R.*, t. CXXVIII, p. 185.

pendant longtemps conserver de l'ammoniaque non combinée¹; si elle existe, elle a dû entrer en combinaison avec les acides du milieu. Pour la caractériser avec certitude, il faut la déplacer par une base, puis la distiller; or, si l'on chauffe avec une base un liquide contenant de la matière organique, ce qui est précisément le cas actuel, celle-ci est attaquée, et de l'ammoniaque se dégage, alors que le liquide primitif n'en renfermait pas trace. Avec la magnésie calcinée, préconisée par Bous-singault, l'attaque est faible, mais elle existe, je l'ai constatée moi-même, après bien d'autres; point n'est besoin de chauffer à 100° pour obtenir ce résultat, une température de 50° suffit. A la température ordinaire seulement, cette attaque ne se produit pas, tout au moins rapidement.

Aussi ai-je opéré à froid. La méthode que j'ai employée consiste à faire, avec la trompe à eau, le vide dans le ballon qui contient le liquide de culture additionné de magnésie; au sortir du ballon et avant de se rendre à la trompe, les gaz extraits, parmi lesquels se trouve l'ammoniaque mise en liberté, traversent un barboteur contenant le réactif de Nessler.

Je me suis assuré, par des essais préliminaires, que cette méthode est très sensible, elle permet de reconnaître la présence dans le ballon de simples traces d'un sel ammoniacal, et comme dans ces conditions la magnésie ne saurait attaquer la matière organique, elle offre une grande sécurité.

En appliquant ce procédé de recherche à l'étude du liquide de culture, j'ai reconnu que le Nessler se trouble très légèrement en prenant une teinte jaune extrêmement pâle, comme si le liquide contenait une trace d'un sel ammoniacal.

Je crois donc que le cystococcus est capable de réduire les nitrates; je ne puis être plus affirmatif, ne pouvant baser mon opinion que sur une réaction, qui n'est pas très nette.

D'ailleurs, l'ammoniaque, je vais le montrer, est un excellent aliment pour la plante; elle doit donc être consommée aussitôt produite, et son absence du liquide de culture ne prouve pas que les nitrates sont assimilés sans être réduits.

La lumière n'est évidemment pas nécessaire pour que l'azote nitrique soit assimilé, les récoltes abondantes que j'ai obte-

1. On sait que M. Schlösing a fondé sur ce fait une méthode de dosage de l'ammoniaque en présence des matières organiques azotées.

nues à l'obscurité en sont témoins; mais ignorant si la totalité des nitrates doit être réduite pour être utilisée, je ne puis dire si cette réduction est possible ou non à l'obscurité.

L'étude du rôle de la lumière dans l'assimilation de l'ammoniaque trouvera sa place tout naturelle dans le chapitre suivant.

III

ASSIMILATION DE L'AZOTE AMMONIACAL

L'azote ammoniacal est certainement consommé par les végétaux; la pratique agricole le donnait à penser depuis longtemps: les travaux de Müntz¹, de Mazé² l'ont prouvé d'une manière incontestable.

L'action sur les plantes des sels ammoniacaux n'est cependant pas comparable à celle des nitrates, car ceux-là peuvent devenir toxiques dans certains cas.

Depuis longtemps Bouchardat³, Cloëz avaient signalé le fait; tout récemment Mazé⁴ a fait voir que, s'il était possible de faire pousser du maïs dans une solution minérale contenant 2 0/00 de nitrate de sodium, on ne pouvait, sans préjudice pour la plante, remplacer le nitrate par un même poids de sulfate d'ammonium; aux doses inférieures à 0,5 0/00, le sel ammoniacal est aussi bon aliment que le nitrate, mais aux doses supérieures il est toxique.

Sur la première transformation que subit l'ammoniaque pour être assimilée, les opinions diffèrent. Les uns, avec Molisch, Kreusler, Laurent⁵, pensent qu'elle est assimilée directement sans être oxydée dans aucun cas; les autres, comme Berthelot et André, Heckel⁶, Lundstrøm⁷, soutiennent que les nitrates peuvent prendre naissance dans les tissus végétaux.

Relativement au rôle de la lumière dans l'assimilation des sels ammoniacaux, les avis sont encore partagés.

Pour MM. Pagnoul⁸, Müntz⁹, Kinoshita¹⁰, les plantes peuvent

1. MUNTZ, *C. R.*, CIX.

2. MAZÉ, *Ann. Inst. Past.*, janv. 1900.

3. BOUCHARDAT, *C. R.*, 1843, XVI.

4. MAZÉ, *loc. cit.*

5. LAURENT, *Ann. Inst. Past.*, 1889, III.

6. HECKEL, *C. R.*, 1890, CX.

7. BERTHELOT et ANDRÉ, *Ann. de Chim. et de Phys.*, 1886, VIII.

8. PAGNOUL, *loc. cit.*

9. MUNTZ, *loc. cit.*

10. KINOSHITA, *Centralb. für agrik. Chem.*, 1896, p. 362.

faire à l'obscurité la synthèse de leurs matières protéiques aux dépens de l'ammoniaque; la lumière y aiderait beaucoup, mais son absence ne l'empêcherait pas absolument. Tout au contraire, MM. Laurent, Marchal et Carpiaux, Godlewsky se refusent à admettre l'assimilation de l'azote ammoniacal à l'obscurité.

J'ai dû me demander quelles réponses permettait de faire à ces diverses questions l'étude du *cystococcus humicola*.

Le milieu de culture que j'ai toujours employé a été, pour la circonstance, légèrement modifié, le nitrate devant être remplacé par un sel ammoniacal; il avait la composition suivante :

Sulfate de magnésium.....	1 gramme.
Phosphate bipotassique.....	2 grammes.
Chlorure de calcium.....	0 ^{gr} ,023
Sulfate d'ammonium.....	0 ^{gr} ,5
Sulfate ferreux.....	traces.
Glucose.....	10 grammes.
Eau.....	1000 grammes.

Les cultures sont faites dans les fioles plates, dites boîtes à culture de M. Roux, contenant chacune 100 c. c. de liquide nutritif; j'ai également cultivé la plante dans un liquide renfermant deux fois plus d'ammoniaque, soit 1 0/00 de sulfate d'ammonium au lieu de 0,5 0/00.

Les cultures, dans ces milieux, débutent un peu plus tôt que dans ceux qui sont nitrates: elles ont au moins 24 heures d'avance, — ce qui s'explique bien en supposant que les nitrates doivent être réduits pour être assimilés. Huit jours après l'ensemencement, les récoltes sont très développées, très vertes, aussi abondantes dans les milieux plus riches en ammoniaque que dans ceux qui le sont moins.

Au bout de 13 jours de culture, dans le liquide renfermant 0,5 0/00 de sulfate d'ammonium, la plante est encore très verte; ses cellules ne contiennent aucun grain d'amidon; le poids de la récolte, qui est de 95 milligrammes, témoigne que l'azote de l'ammoniaque a été assimilé.

Mais la récolte est bien faible, eu égard à ce qu'elle eût été en présence du nitrate de potassium.

L'examen de la marche d'une culture peut nous en donner la raison. J'ai étudié une récolte vieille de 13 jours, je vais en examiner une vieille de 19; la comparaison des deux nous éclaircira.

La plante, qui, après 13 jours de développement, était très verte, se met à jaunir ensuite; en sorte que, 6 jours plus tard, elle a pris une couleur vert jaune qui dénote un état pathologique; ses cellules sont devenues grosses, leur paroi est mince, elles sont un peu jaunes (à l'examen microscopique), quelques-unes complètement incolores; aucune ne renferme d'amidon. Le poids de la récolte s'élève à 96 milligrammes, il est resté identique à ce qu'il était 6 jours auparavant.

A partir du 13^e jour, le *cystococcus* ne s'est donc plus développé; il est même probable que cet arrêt de la culture datait déjà d'un ou de plusieurs jours au moment où je l'ai constaté. La plante se serait rapidement multipliée jusqu'à ce que le poids de la récolte atteigne 95 milligrammes, après quoi la division cellulaire se serait arrêtée.

A quelle cause rattacher cette anomalie? La plante ne manque pas de sucre; le 13^e jour il en reste encore 832 milligrammes dans son milieu de culture; elle ne manque pas d'azote non plus; dans les milieux renfermant 1 0/00 de sulfate d'ammonium, au lieu de 0,5 0/00, elle se comporte de même; enfin l'ammoniaque n'a exercé aucune action antiseptique, puisqu'elle est consommée très rapidement au début, alors qu'elle est en plus grande quantité dans le liquide. En somme, tout se passe comme si, en prenant son azote au sulfate d'ammonium, la plante fabriquait un produit toxique, qui empêche son développement ultérieur.

Nous avons vu, en étudiant l'assimilation de l'azote nitrique, qu'il est possible que les nitrates soient réduits dans les cellules. Ce que nous venons de voir de l'assimilation de l'azote ammoniacal prouve que cette réduction ne saurait porter sur la totalité des nitrates, toute l'ammoniaque ainsi produite ne pouvant être utilisée.

L'ammoniaque est absorbée en nature, sans être oxydée auparavant, le liquide de culture ne donnant pas la moindre coloration bleue avec le sulfate de diphénylamine. Si donc, avant d'être assimilée, l'ammoniaque doit être oxydée, elle ne peut l'être qu'à l'intérieur des cellules; or, j'ai épuisé la plante par l'eau bouillante et reconnu que ce liquide filtré prend, avec le sulfate de diphénylamine, une coloration bleue très faible, mais très nette.

Il est par suite très probable que les cellules contiennent des nitrates; il y a probabilité et non certitude, car, on le sait, d'autres oxydants que l'acide nitrique, tels les nitrites, peuvent donner une coloration bleue avec la diphénylamine; je puis ajouter, d'ailleurs, que dans le cas actuel la coloration bleue ne serait pas due aux nitrites; le liquide d'épuisement, ne donnant aucune coloration avec le réactif de Griess (acide sulfanilique et naphtylamine), n'en renferme pas.

Il me semble très vraisemblable que l'algue oxyde, avant de l'assimiler, une partie au moins de l'ammoniaque qu'elle a absorbée.

Peu importerait donc que l'on offre à la plante de l'azote soit nitrique, soit ammoniacal, celle-ci s'arrangeant toujours pour en avoir à sa disposition sous les deux formes.

Quelle est l'influence de la lumière sur l'assimilation de l'ammoniaque? J'ai fait 2 séries de cultures ayant duré les unes 13 jours et les autres 19, pour être renseigné: les poids des récoltes sont indiqués dans le tableau suivant.

MODE D'ÉCLAIREMENT	POIDS DES RÉCOLTES EN MILLIGR.	
	au bout de 13 jours.	au bout de 19 jours.
A la lumière	95	96
A l'obscurité	37	87

La culture se fait un peu plus lentement à l'obscurité qu'à la lumière, mais elle se fait incontestablement: les cellules, développées à l'obscurité, sont très riches en amidon, celles qui ont vu la lumière ne le sont pas: les chiffres de la seconde ligne sont donc en réalité un peu trop forts puisque l'amidon, substance non organisée, a été pesé en même temps que le protoplasma, mais ils indiquent le sens du phénomène: c'est tout ce qu'on leur demande.

La lumière n'est pas indispensable pour que l'azote ammoniacal soit assimilé, l'expérience ne me permet pas de dire plus.

IV

ASSIMILATION DE L'AZOTE ORGANIQUE

Il est dans le sol de grandes quantités d'azote organique, que les infiniment petits transforment en azote ammoniacal d'abord, en azote nitrique ensuite. Les plantes supérieures doivent-elles attendre la destruction de la matière organique pour s'emparer de son azote, ou peuvent-elles l'assimiler alors qu'il est encore en combinaison avec le carbone?

La question est assez intéressante pour mériter une étude approfondie, qui du reste est encore à faire; jusqu'ici elle n'a même pas été abordée pour ainsi dire. Ce sujet, sortant du cadre que je m'étais tracé, n'a été l'objet de ma part que de fort peu d'expériences, dont je vais donner les résultats.

Je me suis seulement demandé si la plante pouvait assimiler l'azote de l'asparagine, que l'on rencontre très souvent dans les végétaux, et celui de la peptone, et quel rôle la lumière peut jouer dans cette assimilation.

Les milieux de cultures employés ont été les suivants :

Sulfate de magnésium.....	1 gr.	Sulfate de magnésium.....	1 gr.
Phosphate bipotassique....	2 gr.	Phosphate bipotassique....	2 gr.
Asparagine.....	1 ^{er} ,8	Peptone Witte.....	1 ^{er} ,8
Chlorure de calcium.....	0 ^{er} ,1	Chlorure de calcium.....	0 ^{er} ,1
Sulfate ferreux.....	0 ^{er} ,05	Sulfate ferreux.....	0 ^{er} ,05
Glucose.....	10 gr.	Glucose.....	10 gr.
Eau.....	1000 gr.	Eau.....	1000 gr.

L'asparagine et la peptone ont été dissoutes à part, et leurs solutions stérilisées par filtration; celles-ci ont été ajoutées aux solutions minérales sucrées stérilisées à part à l'autoclave.

Pour pouvoir comparer les cultures faites dans ces milieux avec celles qui eussent poussé, dans les mêmes conditions, sur un milieu nitraté, j'ai en même temps cultivé la plante dans le liquide suivant :

Sulfate de magnésium.....	1 gr.
Phosphate bipotassique.....	2 gr.
Nitrate de calcium.....	1 gr.
Sulfate ferreux.....	0 ^{er} ,05
Glucose.....	10 gr.
Eau.....	1000 gr.

Une partie des cultures était maintenue à l'obscurité, l'autre exposée à la lumière; les poids des récoltes obtenues en 14 jours sont indiqués dans le tableau suivant :

SOURCE D'AZOTE	POIDS DES RÉCOLTES EN MILLIGR.	
	à la lumière.	à l'obscurité.
Asparagine	150	37
Peptone	127	48
Nitrate de calcium	578	49

Le cystococcus peut prendre de l'azote à l'asparagine et à la peptone, mais aucune de ces deux substances n'est une source d'azote comparable au nitrate de calcium : elles lui sont inférieures.

L'azote de l'asparagine et de la peptone est certainement assimilé à l'obscurité.

Dans les 6 cultures ci-dessus la plante était très verte, sauf dans celle faite à la lumière et en présence de peptone, où elle avait une couleur jaune très prononcée.

En somme, le cystococcus peut, même à l'obscurité, assimiler l'azote des matières organiques.

CONCLUSIONS

L'algue ne prend pas d'azote à l'atmosphère.

Elle assimile très facilement les nitrates à la lumière comme à l'obscurité, en en réduisant peut-être une partie à l'état d'ammoniaque.

Elle consomme également l'azote ammoniacal, probablement en l'oxydant partiellement. La lumière n'est pas indispensable pour cela.

Elle peut prendre de l'azote à des matières organiques, l'asparagine et la peptone, par exemple.

Recherches sur l'absorption de la toxine tétanique

PAR MM. V. MORAX ET A. MARIE,

(DEUXIÈME MÉMOIRE ¹)

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Nous avons montré, dans un précédent mémoire, que la tétanine, absorbée à la périphérie des nerfs rachidiens, se déplace continuellement vers leur centre cellulaire, en réalisant ainsi un véritable courant cellulipète.

Les résultats expérimentaux nous ont fait admettre que ce courant se produisait dans la substance nerveuse cylindraxile. Il importait de savoir si les différentes variétés de fibres nerveuses présentaient, à l'égard de la tétanine, les mêmes propriétés. On sait, en effet, que les nerfs rachidiens, le sciatique par exemple, sur lequel portent la plupart de nos expériences, sont constitués par la réunion de trois types de fibres nerveuses : des fibres motrices, des fibres vaso-motrices et des fibres sensitives. L'absorption de la tétanine se fait-elle indifféremment par ces trois types de fibres, ou bien existe-t-il une affinité spéciale de la toxine tétanique pour le neurone moteur périphérique ? Voilà la question à laquelle nous avons cherché à répondre par l'expérience.

On sait qu'à l'inverse des nerfs rachidiens, certains nerfs craniens ne contiennent qu'une des variétés de filets nerveux. Tout au moins la prédominance d'une des variétés de fibres est telle, qu'on peut considérer comme purement sensitif l'ophtalmique de Willis (branche supérieure du trijumeau), comme purement moteur le massétéрин (branche motrice du trijumeau), comme purement vaso-moteur le sympathique cervical. Il paraissait donc indiqué de répéter l'expérience de Meyer dans le territoire innervé par ces nerfs ; toutefois, le trajet compliqué de ces troncs nerveux et leur brièveté chez le cobaye ne permettaient pas d'utiliser cet animal. Nous avons été forcés d'expérimenter sur

1. A. MARIE et V. MORAX. Recherches sur l'absorption de la toxine tétanique. Ces *Annales*. nov. 1902. p. 818.

le chien, en ce qui concerne l'absorption de la tétanine par les fibres sensitives du nerf ophtalmique de Willis.

Exp. I.— Un chien de 1.850 grammes reçoit, le 19 avril 1902, dans le tissu cellulaire sous-cutané de la région frontale gauche, une solution de 0 gr. 01 de tétanine dans un c. c. d'eau. Le 20 avril, aucun symptôme. Le 21 avril, l'animal est en plein tétanos : il a de la peine à se tenir sur ses pattes et n'y parvient qu'en les maintenant écartées. La tête est déviée du côté droit; la paupière droite est fermée. On tue l'animal par asphyxie, puis on dissèque le nerf ophtalmique de Willis dans son trajet orbitaire, d'autant plus facile à suivre qu'il chemine immédiatement au-dessous du périoste orbitaire. Ce nerf est inséré sous la peau d'une souris qui présente, après 24 heures, un tétanos local manifeste.

Il ressort de cette expérience que les fibres sensitives dont est constitué le nerf ophtalmique de Willis ont absorbé la tétanine; on peut objecter, il est vrai, que l'ophtalmique de Willis renferme quelques fibres vaso-motrices et qu'on ne saurait, par conséquent, conclure en toute certitude à l'affinité de la tétanine pour les fibres sensitives. Quoi qu'il en soit, cette première expérience nous semblait de nature à ébranler l'opinion qui paraissait la plus vraisemblable, et d'après laquelle le neurone périphérique moteur devait seul absorber la tétanine.

Pour aborder le problème par une autre de ses faces, nous résolûmes de modifier notre mode expérimental en recherchant à la fois, quantitativement et qualitativement, la tétanine dans les différents nerfs rachidiens, dans les racines, dans les nerfs craniens ou sympathiques.

Après injection, en un point donné d'une région musculaire, d'une dose plusieurs fois mortelle de tétanine, nous attendions la mort de l'animal pour rechercher la teneur en tétanine des humeurs, et d'un poids égal des différents nerfs ou racines, rachidiens et craniens, ainsi que du tissu nerveux central.

L'expérience a porté tout d'abord sur une ponette, que M. le P^r Nocard a bien voulu mettre à notre disposition, ce dont nous lui sommes vivement reconnaissants.

Exp. II.— Une ponette de 334 kilogrammes reçoit, le 23 janvier 1903, 3 gr. de toxine tétanique dissoute dans 20 c. c. d'eau; l'injection est poussée dans le gastrocnémien de la jambe postérieure gauche. Le 24 janvier 1903, au matin, on constate déjà de la contracture locale; le trismus et un tétanos généralisé lui succèdent rapidement. La mort survient dans la nuit du 24 au 25 janvier, un peu moins de 3 jours après l'inoculation.

L'autopsie ne put être pratiquée que le surlendemain 27 janvier, mais le froid rigoureux qui régnait alors rendait ce retard de peu d'importance.

Grâce à M. le Pr Petit, de l'École d'Alfort, qui a bien voulu opérer l'autopsie du cheval, nous avons pu prélever un très grand nombre de nerfs rachidiens ou craniens, ainsi que les centres médullaires et encéphaliques. Les nerfs étaient répartis dans des tubes stériles et étiquetés.

Pour la moelle, nous avons pu isoler d'emblée les racines postérieures entre le ganglion et la pénétration dans la corne postérieure, les racines antérieures, les cordons blancs (faisceaux postérieurs, latéraux, antérieurs) dans la région lombaire et la région dorsale. Nous avons prélevé les faisceaux pyramidaux au niveau du bulbe, de la protubérance, des pédoncules et de la capsule interne.

De chacun de ces nerfs ou de ces cordons blancs de la moelle, nous avons pesé 0 décigr. 1. Cette petite masse était divisée en deux moitiés, et chacune de ces parts, soit environ 0 centigr. 05, était insérée sous la peau d'une souris. On eut soin d'inoculer deux souris de poids différent : l'une, petite, de 10 grammes en moyenne, et l'autre plus forte, et pesant entre 15 et 20 gr.

Les nerfs étaient dépouillés de la graisse qui les entoure et séchés rapidement entre deux feuilles de papier-filtre stérilisé, avant d'être pesés.

Nous avons montré, dans notre précédent mémoire, qu'il suffisait d'une macération d'assez courte durée dans l'eau physiologique pour que le nerf se dépouillât de la totalité de sa toxine.

Aussi, pour contrôler les résultats obtenus par l'inoculation directe du tissu nerveux sous la peau de la souris, nous avons mis à macérer un poids donné des différents nerfs dans un c. c. d'eau physiologique, dont nous avons inoculé une dose correspondant à la macération de 0 gr. 1 de tissu nerveux ou musculaire.

Les expériences de cette série permettront de comparer les tissus musculaires et nerveux au point de vue de leur teneur en toxine. Nous avons inséré du tissu musculaire de la région crurale des pattes postérieures gauche et droite à quatre souris, qui sont mortes d'infection au 3^e jour sans avoir présenté de signes de tétanos. L'expérience de la macération montre que la quantité de tétanine contenue dans un poids correspondant de tissu musculaire est très inférieure à celle que renferment les nerfs sciatiques ou les nerfs craniens.

La toxine que nous avons utilisée pour toutes ces expériences a été préparée par précipitation au sulfate d'ammoniaque d'une culture tétanique abondante faite en symbiose avec le subtilis. La dose mortelle pour la souris de 15 grammes est de 0 gr. 0000005. En supposant une diffusion égale de la toxine injectée dans l'organisme du cheval, 0 gr. 05. de chacun de ses tissus devrait contenir une dose mortelle pour la souris.

Un simple examen du résultat des inoculations montre qu'il y a à ce point

1. Nous rappelons la signification des signes conventionnels utilisés dans nos tableaux pour indiquer les troubles présentés par les animaux en expérience :

0	signifie pas de symptômes tétaniques.
—	« tétanos local léger.
=	« tétanos local très accusé.
≡	« tétanos généralisé.
+	« mort.

	TISSUS INOCULÉS	POIDS	ANIMAL	POIDS	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6	7	11
Humeurs	Sang.....	0.1	Souris.	14 gr.	=	=	+									
	Sang.....	0.5	»	15 gr.	=	+										
	Liq. céphal. rachidien.....	0.1	»	12 gr.	O	=	=	=	=	+						
	Humeur aqueuse.....	0.1	»	12 gr.	O	O	-	-	=	=	=	=	=	=	=	=
Nerfs rachidiens	Sciatique gauche.....	0.05	»	10 gr.	=	+										
	» ».....	0.05	»	16 gr.	O	=	=	+								
	Sciatique droit.....	0.05	»	12 gr.	O	O	=	=	=	=	=	=	=	+		
	Nerf cubital.....	0.05	»	10 gr.	O	O	-	-	=	=	=	=	=	=	=	=
» ».....	0.05	»	20 gr.	O	O	O	O	-	=	=	=	=	=	=	=	=
Nerfs crâniens	Sympathique cervical.....	0.05	»	11 gr.	O	=	+									
	» ».....	0.05	»	18 gr.	O	-	=	+								
	Nerf massétérin.....	0.05	»	7 gr.	O	=	=	+								
	» ».....	0.05	»	16 gr.	O	O	=	=	+							
	Nerf ophtalm. de Willis.....	0.05	»	12 gr.	O	-	=	+								
	» ».....	0.05	»	16 gr.	O	O	=	=	+							
	Pneumo-gastrique.....	0.05	»	9 gr.	O	-	=	=	+							
	» ».....	0.05	»	18 gr.	O	-	=	=	=	+						
	Lingual.....	0.05	»	10 gr.	O	-	=	=	=	+						
» ».....	0.05	»	18 gr.	O	-	=	=	=	=	=	+					
Rac. rachidiennes lombaires	Rac. antér. g. lombaire.....	0.05	»	8 gr.	O	-	=	=	+							
	» ».....	0.05	»	18 gr.	O	O	-	=	=	=	+					
	Rac. antér. dr. lombaire.....	0.05	»	10 gr.	O	-	=	=	+							
	» ».....	0.05	»	17 gr.	O	-	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Rac. postér. g. lombaire.....	0.05	»	9 gr.	O	-	=	=	=	=	=	+				
Côl. médull. lomb.	» ».....	0.05	»	11 gr.	O	-	=	=	=	=	=	=	+			
	Rac. postér. dr. lombaire.....	0.05	»	8 gr.	O	-	=	=	=	=	=	=	=	+		
	» ».....	0.05	»	12 gr.	O	-	=	=	=	=	=	=	=	=	+	
	Faisc. pyramidal gauche.....	0.1	»	18 gr.	O	-	=	+								
	Faisc. pyramidal droit.....	0.1	»	24 gr.	O	O	-	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Rég. dorsale	Faisc. postér. gauche.....	0.1	»	24 gr.	O	O	-	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Faisc. antér. gauche.....	0.1	»	20 gr.	O	-	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Faisc. antér. droit.....	0.1	»	21 gr.	O	-	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	Faisc. pyramidal gauche.....	0.05	»	10 gr.	Pas de tétanos											
	Faisc. pyramidal droit.....	0.05	»	8 gr.	»											
Bulbe	Faisc. postér. droit.....	0.05	»	9 gr.	O O O O O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Faisc. postér. gauche.....	0.05	»	8 gr.	Pas de tétanos											
	Pyramides antér. gauche.....	0.05	»	11 gr.												
	Pyramides antér. droit.....	0.05	»	17 gr.												
Pédoncules	Pyramides antér. gauche.....	0.05	»	15 gr.	Pas de tétanos											
	Pyramides antér. droit.....	0.05	»	24 gr.												
	Pédoncule dr. zone interne.....	0.1	»	17 gr.	Pas de tétanos											
	Pédoncule dr. zone externe.....	0.1	»	17 gr.	O O O -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cerveau	Pédoncule g. zone interne.....	0.1	»	14 gr.	Pas de tétanos											
	Pédoncule g. zone externe.....	0.1	»	15 gr.	»											
	Capsule interne droite.....	0.1	»	13 gr.												
	» ».....	0.1	»	12 gr.	Pas de tétanos											
	Nerf optique.....	0.7	»	14 gr.												

de vue des différences considérables, déjà très manifestes. en ce qui concerne les humeurs (sang, liquide céphalo-rachidien, humeur aqueuse).

TISSUS MACÉRÉS	POIDS	ANIMAL	POIDS	29	30	31	1	2	3	4	5	6	11
Sciatique gauche.....	0.1	Souris...	11 gr.	=	+								
Sympathique.....	0.1	»	15 gr.	—	≡	+							
Zygomatique.....	0.1	»	16 gr.	O	O	=	≡	+					
Massétérin.....	0.1	»	15 gr.	O	=	=	=	=	+				
Lingual.....	0.1	»	15 gr.	—	—	≡	≡	+					
Muscle crural gauche.....	0.1	»	15 gr.	—	=	=	=	=	≡	≡	≡	≡	+
Sciatique droit.....	0.1	»	20 gr.	O	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Cubital droit.....	0.1	»	17 gr.	O	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Nerf optique.....	0.1	»	19 gr.	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O

Analysons les résultats obtenus.

Nous voyons tout d'abord que le nerf dont les fibres innervent la région inoculée se charge tout particulièrement de toxine : 0 gr. 05. du sciatique gauche a tué la souris en deux jours, alors qu'un poids double de sang, (0 c. c. 1), n'a déterminé la mort qu'en trois jours. Le sciatique du côté opposé à l'injection, les nerfs rachidiens éloignés du point d'injection, renferment, à dose relativement petite, de la tétanine. La faible intensité de cette absorption apparaît nettement si on compare les souris inoculées avec les nerfs rachidiens avec celles qui ont reçu les nerfs sympathiques et les nerfs craniens.

La proportion considérable de toxine contenue dans le sympathique cervical est un fait des plus intéressants, et qui nous paraît démontrer à l'évidence la part très marquée que prennent les neurones sympathiques à l'absorption de la tétanine. On peut supposer que cette absorption se fait tout particulièrement au niveau des parois musculaires par les fibres vaso-motrices, puisque le sang est toujours abondamment chargé de toxine.

On est frappé aussi de la proportion de toxine contenue dans le nerf massétérin, nerf exclusivement moteur, rameau de la 5^e paire crânienne, et qui innerve les muscles masticateurs. Ce pouvoir d'absorption du massétérin nous fait comprendre comment il peut se faire qu'un des symptômes les plus précoces du tétanos chez le cheval consiste précisément dans le trismus. On s'explique aisément qu'en puisant la tétanine dans le

sang, les fibres nerveuses, dont le pouvoir d'absorption est le plus intense, manifesteront les premières les symptômes qui attestent la souffrance des centres nerveux auxquels ces fibres correspondent.

Le nerf ophtalmique de Willis, nerf presque exclusivement sensitif, renferme à peu près autant de toxine que le nerf massétérin. Il en est de même du pneumogastrique et du lingual.

En ce qui concerne le pouvoir absorbant des neurones sensitifs et moteurs, l'inoculation des racines rachidiennes lombaires, antérieures et postérieures, nous fournit des indications intéressantes. Les racines postérieures droites et gauches renferment un peu moins de toxine que les racines antérieures, mais la différence n'est pas considérable et elle ne nous paraît pas de nature à faire supposer, entre ces deux ordres de fibres, des propriétés d'absorption distinctes.

De l'ensemble de l'expérience II, il nous semble se dégager très nettement cette notion inattendue *que les trois types de neurones périphériques, le moteur, le sensitif et le sympathique, sont également aptes à absorber la toxine tétanique.*

Les autres résultats obtenus par l'inoculation du système nerveux central sont moins intéressants pour la question envisagée dans ce mémoire, néanmoins nous pouvons nous y arrêter un instant.

D'une manière générale, il ressort de cette expérience, qu'alors même qu'on inocule à la souris seulement le faisceau des fibres nerveuses, à l'exclusion de toute cellule des cornes antérieures ou postérieures (chez le cheval, la dissection des faisceaux blancs de la moelle est des plus faciles), on ne parvient pas à déceler la présence de la toxine tétanique dans le neurone cérébral. La très petite quantité de tétanine, trouvée dans les faisceaux blancs de la moelle de la région lombaire, provient, selon toute vraisemblance, de ce qu'à ce niveau il y avait mélange des fibres nerveuses du neurone périphérique, fortement chargées de toxine (neurones moteurs et sensitifs du sciatique), avec les faisceaux pyramidaux (prolongement cylindraxile des neurones cérébraux). On sait, en effet, que les prolongements cylindraxiles des neurones moteurs, qui vont constituer les nerfs rachidiens, ne quittent pas immédiatement la moelle après leur naissance des cellules des cornes antérieures, mais qu'ils

accomplissent un court trajet vertical avant de sortir de la moelle, au-dessus ou au-dessous de leur point d'origine.

Cette disposition fait qu'en prélevant des cordons blancs de la moelle au niveau de la région lombaire, on obtient forcément un mélange de fibres chargées de toxine et de fibres faisant partie des neurones cérébraux. Lorsqu'on prélève hors de la région lombaire le faisceau pyramidal, on constate que son inoculation est absolument inoffensive pour la souris. Il en est de même des autres cordons médullaires, et les deux exceptions (faisceau postérieur droit de la région dorsale, et zone externe du pédoncule droit) nous paraissent s'expliquer par une petite hémorragie ayant mêlé un peu de toxine aux fibres nerveuses.

Il semble donc ressortir de l'inoculation des centres cérébro-médullaires (cordons blancs) que le cylindraxe du neurone cérébral ne renferme pas de tétanine libre. L'absence complète de tétanine décelable dans le nerf optique est une confirmation des plus nettes de cette déduction. On sait en effet que le nerf optique n'est pas, en réalité, un nerf, mais un prolongement du cerveau. Les cylindraxes qui le constituent ne sont pas, à l'égard des autres nerfs craniens, des cylindraxes sensitifs ou moteurs des neurones périphériques, mais représentent des neurones cérébraux. Dans l'espèce, le neurone périphérique est tout entier contenu dans la réfine, entre l'élément percepteur (cône et bâtonnet) et les ramifications de la cellule ganglionnaire, cellule visuelle, dont le cylindraxe formera le nerf optique. Nous reviendrons sur l'interprétation de ces résultats, et nous ne nous y arrêtons que pour expliquer la différence existant entre les nerfs craniens et le nerf optique.

A l'appui de nos déductions basées sur l'expérience II, nous pouvons citer encore une autre expérience faite sur le singe.

Exp. III. — Un singe cercopithèque, du poids de 2 kil. 250, reçoit, le 21 février 1903, 0gr. 005 de toxine tétanique dans les muscles gastrocnémiens de la patte postérieure droite. Il succombe au bout de 48 heures.

A l'autopsie, faite le lendemain, on prélève des nerfs rachidiens et craniens pour les inoculer, à dose déterminée, à des souris. Voir le tableau, p. 342.

Ici encore, la propriété d'absorption des fibres sympathiques apparaît d'autant plus nettement, que le poids du nerf sympathique cervical, avec son ganglion, ne réalisait que le 1/3 de la quantité de nerf sciatique ou de sang inoculée.

TISSUS INOCULÉS	POIDS	ANIMAUX	POIDS	24	25	26	27	28	1	2	3	4	5	OBSERVATIONS
Sang	0.1	Souris	25	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Sciatique droit	0.1	»	20	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	
» »	0.1	»	15	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	
Sciatique gauche	0.1	»	12	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Morte d'infection.
Brachial droit	0.1	»	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
» gauche	0.1	»	19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Symphatique cervical	0.03	»	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Pneumo-gastrique	0.05	»	11	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	
Rac. rachid. lomb. post. dr.	0.1	»	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
» » » g.	0.1	»	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	Morte d'infection.
Rac. rachid. lomb. antér. droite et gauche	0.1	»	12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Moelle lombaire	0.8	»	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Moelle dorsale	0.8	»	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

De tous ces faits, on doit conclure que l'absorption, quantitativement non qualitativement différente des trois types de neurones périphériques à l'égard de la toxine tétanique permet, dans une certaine mesure, d'expliquer l'ordre d'apparition des symptômes moteurs. C'est ainsi que chez le cheval, le trismus précoce pourrait s'expliquer par le fait que le nerf massétéren absorbe plus rapidement la toxine que les autres nerfs moteurs. Peut-être même la rapidité d'absorption résulte-t-elle seulement des dimensions de la cellule nerveuse.

On peut supposer, en effet, que la brièveté seule du neurone massétéren en rend plus rapide la saturation par la toxine. La conséquence de cette saturation rapide, c'est que le neurone cérébral avec lequel s'articule le neurone massétéren sera lui-même plus rapidement atteint. Quoi qu'il en soit, il est un fait que ces constatations ne contribuent pas à éclaircir : nous voulons parler de la nature purement motrice des symptômes tétaniques. Après avoir constaté la présence de la toxine tétanique dans les nerfs périphériques, on pouvait supposer qu'elle était spécialement absorbée par le neurone périphérique moteur. Le fait que les différents neurones périphériques l'absorbent également nous semble être en faveur de l'hypothèse d'après laquelle la localisation toxique spécifique se produit, non dans le neurone périphérique, mais plus haut, dans les neurones cérébraux : les neurones périphériques ne constitueraient que des canaux par lesquels la toxine atteint les neurones cérébraux.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE des substances actives des sérums normaux.

Sur la pluralité des alexines.

PAR LE D^r L. REMY.

Tandis que Buchner (1) et Bordet (2) sont partisans de l'unité des alexines hémolytique et bactériolytique, Metchnikoff (3) admet l'existence de deux alexines : l'une hémolytique, l'autre bactériolytique, alors que Ehrlich et Morgenroth (4), Neisser (5), Wechsberg (6) défendent la pluralité des alexines hémolytiques et des alexines bactériolytiques.

Quels sont les faits scientifiques que l'on peut invoquer à l'appui de ces différentes opinions ? L'expérience la plus importante sur laquelle se basent les unicistes pour affirmer l'unité des alexines hémolytique et bactériolytique est la suivante : si à un sérum neuf non chauffé on ajoute des bactéries sensibilisées, celles-ci fixent toute la cytase que contenait le sérum, car celui-ci est impuissant non seulement à hémolyser des globules rouges sensibilisés, mais encore à réactiver un sérum bactéricide précédemment privé d'alexines. Le sérum non chauffé ne contenait donc qu'une seule alexine, et celle-ci était à la fois hémolytique et bactériolytique, car, s'il y avait eu deux espèces d'alexines, les bactéries ajoutées d'abord n'auraient utilisé que l'alexine bactériolytique, et l'alexine hémolytique restant dans le sérum aurait alors pu réactiver un sérum hématique préalablement chauffé. Si, au lieu de bactéries sensibilisées, on introduit d'abord des globules rouges sensibilisés dans le sérum, celui-ci sera privé de toute action hémolytique et bactériolytique. Il n'y a donc qu'une seule alexine dans le sérum, et celle-ci est à la fois globulicide et bactéricide.

La théorie de la dualité des alexines : une alexine hémolytique, une alexine bactériolytique, repose sur les faits observés par Metchnikoff (8) dans son travail sur la résorption des cel-

lules, à savoir : 1° que celles-ci sont presque exclusivement phagocytées par les macrophages ; 2° que seuls les extraits macrophagiques : épiploon, ganglions mésentériques et rates possèdent des propriétés hémolytiques.

Les recherches entreprises par Gengou (9), au laboratoire de Metchnikoff, sur l'origine de l'alexine des sérums normaux, ont montré que seuls les polynucléaires produisaient la cytase hémolytique, tandis que les extraits macrophagiques étaient dénués de tout pouvoir microbicide. Plus récemment, Tarassévitch (10), dans un travail exécuté au laboratoire de Metchnikoff sur les cytases, a prouvé que seuls les organes macrophagiques et les glandes digestives étaient doués de propriétés hémolytantes, tandis que la moelle osseuse, source principale des microphages, était privée de substance hémolytique, mais possédait une action nettement bactéricide. Les propriétés différentes des organes et des extraits doivent donc être attribuées à la présence dans ceux-ci de cytases distinctes, l'une produite par les macrophages, c'est la macrocytase ou cytase hémolytique, l'autre provenant des microphages, c'est la microcytase ou cytase bactériolytique.

La pluralité des alexines ou compléments a surtout été défendue par Ehrlich et Morgenroth (4), Neisser (5), Wechsberg (6) ; il importe toutefois de remarquer que des expériences sur lesquelles ils s'appuient pour admettre l'existence de plusieurs espèces d'alexines, hémolytiques et bactériolytiques, ne sont pas décisives. Neisser (5) attire l'attention sur le fait que le sérum de lapin peut, par l'adjonction de bacilles charbonneux, être privé de ses propriétés bactéricides, tout en conservant son action hémolytique. Wechsberg (6) fait la même constatation pour le sérum de chèvre vis-à-vis du vibron de Nordhafen et des globules rouges de cobayes. Le sérum de chèvre, par l'adjonction de sang de cobaye, perd ses propriétés hémolytiques, mais il conserve son action bactéricide vis-à-vis du vibron de Nordhafen.

Seulement, ces savants ont opéré avec des éléments normaux, et Bordet a montré que la cytase n'est pas intégralement fixée par les éléments non sensibilisés, puisque le sérum, quand il se montre inactif vis-à-vis de ceux-ci, peut encore dissoudre des éléments sensibilisés. De ces observations, ces

auteurs ne peuvent donc pas conclure d'une façon absolue à la pluralité des alexines.

Cet exposé succinct montre que la question du nombre des alexines est loin d'être résolue à l'heure présente. La théorie dualiste paraît cependant être celle qui cadre le mieux avec certains faits nouveaux actuellement établis; seulement, comme le fait judicieusement remarquer Tarassévitch (10) dans son mémoire sur les cytases, il manque à cette théorie la consécration que lui apporterait la preuve de l'existence des deux cytases hémolytique et bactériolytique dans le même sérum sanguin.

C'est cette preuve que M. Metchnikoff a bien voulu nous charger de rechercher lors d'un séjour de quelques mois que nous avons fait à l'Institut Pasteur, dans le courant de l'année dernière. Commencées à son laboratoire, les recherches qui font l'objet du présent mémoire ont été achevées à l'Institut chimique et bactériologique de l'État, à Gembloux.

Nous prions donc M. Metchnikoff d'agréer l'expression de notre profonde reconnaissance non seulement pour le sujet qu'il a bien voulu nous confier, mais encore pour la bienveillance avec laquelle il nous a ouvert ses laboratoires, ainsi que pour les précieux conseils qu'il nous a donnés pendant le séjour que nous y avons fait.

Pour résoudre la question qui fait l'objet de ce mémoire, nous nous sommes adressé au sérum de rats blancs, dont nous avons étudié les propriétés bactéricides et hémolytiques vis-à-vis des éléments normaux et sensibilisés.

A. *Propriétés bactéricides du sérum de rat blanc vis-à-vis de la bactériémie.* Le pouvoir bactéricide du sérum de rat blanc vis à vis de la bactériémie fut découvert par Behring (15) en 1888, et invoqué par lui pour expliquer l'immunité du rat à l'égard de la bactériémie. En 1891, Metchnikoff et Roux (16) montrèrent que les rats n'étaient qu'exceptionnellement réfractaires au charbon, alors que le sérum de tous les rats, même de ceux qui contractaient la maladie, possédait des propriétés bactéricides pour le bacille charbonneux; il n'y avait donc aucun rapport à établir entre l'action bactéricide des humeurs et l'immunité. En 1897, Sawtchenko (14) reprit l'étude des propriétés bactéricides du sérum des rats à l'égard des vaccins I et II. Il constata :

1° que l'action bactéricide était plus puissante vis-à-vis du vaccin I que du vaccin II; 2° que les substances bactéricides résistaient à la température de 55 à 56° pendant une demi-heure, mais que leur action s'affaiblissait par le chauffage à 60-61° pendant une demi-heure; 3° que le sérum de rat immunisé contre la bactériémie n'était pas plus bactéricide que le sérum de rat neuf; 4° que l'on pouvait habituer la bactériémie à vivre dans le sérum de rat blanc.

En 1890, Bordet (11) admet qu'il peut exister dans le sérum de rat des substances bactéricides autres que les alexines. En 1900, Danysz (12) a confirmé ce fait et a précisé le mécanisme par lequel la bactériémie résistait à l'action microbicide du sérum de rat. En 1902, Malvoz (13) conclut qu'il y a dans le sérum de rat deux substances actives très différentes; une alexine semblable à l'alexine de sérum neuf, et une autre substance qui n'est peut-être pas une alexine, douée de propriétés bactéricides et résistant à 56°.

Les résultats auxquels nous sommes arrivé dans le présent mémoire étant en contradiction avec les conclusions des différents savants dont nous venons de rappeler les travaux, nous croyons faire œuvre utile en exposant avec quelques détails les expériences que nous avons entreprises sur cette question.

Pour nos recherches, nous nous sommes servi de la bactériémie charbonneuse provenant des collections de l'Institut Pasteur. Nous avons employé des cultures sur gélose âgées de 18 à 20 heures, dont nous émulsionnions soigneusement une petite quantité dans 10 c. c. d'eau physiologique. Pour chaque expérience, 5 rats blancs étaient saignés et nous opérons avec le mélange des sérums. Celui-ci a été réparti dans de petits tubes en verre. Ces tubes étaient ensemencés avec la même anse en platine, et, après 18 à 20 heures de séjour à l'étuve à 37°, nous prélevions de chacun d'eux une anse de liquide que nous étalions sur gélose inclinée: nous notions le développement après 24 heures de séjour à l'étuve, 37°. Nous avons toujours rejeté les sérums rouges. En appliquant ces données, nous avons entrepris de nombreuses expériences, parmi lesquelles nous choisissons celles qui permettent d'établir rapidement les conditions dans lesquelles il faut se placer pour obtenir des résultats semblables à ceux auxquels nous sommes arrivé.

I

LE POUVOIR BACTÉRICIDE DU SÉRUM DE RAT NE SE MANIFESTE QU'À LA CONDITION QUE L'ENSEMENCEMENT SOIT PRATiqué AVEC DES DOSES CONVENABLES.

Sawtchenko l'avait déjà montré pour les vaccins I et II. Nous avons confirmé ce fait pour la bactériidie. Si à des tubes contenant 20 gouttes de sérum de rat ou d'eau physiologique, on ajoute une, deux ou trois anses d'une émulsion de bactériidies, on constatera que lorsque la quantité des germesensemencés est trop forte, ceux-ci se développent dans le sérum et dans l'eau physiologique. Si les bactéries sont introduites en trop faible quantité, les cultures sont négatives, tant dans le sérum que dans l'eau physiologique, alors que, cependant une expérience de contrôle montre qu'il y avait bien eu apport de bactériidies lors de l'ensemencement. Pourquoi les bactériidies introduites dans les tubes de sérum de rats ou d'eau physiologique ne s'y sont-elles pas développées ? Sont-elles mortes parce qu'elles rencontraient des substances bactéricides, ou parce qu'elles ne pouvaient vivre faute d'éléments nutritifs ? L'addition de deux gouttes de bouillon de bœuf à chacun des tubes de sérum et d'eau physiologique permet de résoudre cette question. Dans les tubes de de rat additionné de bouillon, la bactériidie donne quand même une culture négative ; l'absence de développement dans ce sérum est donc due à la présence d'une substance bactéricide. Dans les tubes d'eau physiologique additionnés de bouillon, on obtient une culture riche en bactériidies, l'absence de développement en eau physiologique seule est donc imputable au manque d'éléments nutritifs.

II

COMMENT SE COMPORTE LA SUBSTANCE BACTÉRICIDE DU SÉRUM DE RAT VIS-A-VIS DE LA CHALEUR ?

L'expérience suivante répond à cette question.

EXPÉRIENCE I

NATURE du liquideensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT après 24 h. des tubes de gélose inclinée, en- semencés avec une anse des tubes de la colonne 1, après un séjour de 24 h. à 37°.
Sérum rat non chauffé, 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 0 0
Sérum rat ch. 55-56°, 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 (1) + (2) +
Sérum rat ch. 60-61°, 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	+ + +
Eau physiolog., 20 g. + 20 g. bouillon. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	+ + +
Eau physiolog. seule, 20 gouttes — —	1 anse 2 anses 3 —	0 100 +
1. 0 indique l'absence de colonies. 2. + indique que le nombre de colonies est trop élevé pour qu'on puisse les compter.		

Elle nous apprend que, dans les mêmes conditions, le sérum de rat non chauffé est nettement bactéricide, tandis que chauffé à 55-56°, il l'est peu, et que, chauffé à 60-61°, il ne l'est plus.

Toutefois, par un ensemencement moins copieux, on peut mettre en lumière les propriétés bactéricides du sérum de rat chauffé à 55-56° ou à 60-61°, pendant 35 minutes. Pour obtenir ce résultat, il faut ensemencer une dose de bactériidies telle que l'eau physiologique, additionnée de bouillon, donne une culture abondante sur gélose, tandis que l'eau physiologique seule n'en donne pas.

Conclusions : 1° le sérum de rat blanc contient une substance bactéricide vis-à-vis de la bactériidie charbonneuse ; 2° l'intensité du pouvoir bactéricide, bien qu'affaibli par l'action des températures 55-56°, 60-61°, pendant 35 minutes, se manifeste encore.

III

COMMENT SE COMPORTE LE SÉRUM DE RAT VIS-A-VIS D'ORGANISMES AUTRES QUE LA BACTÉRIE ?

Les expériences que nous avons entreprises en ensemençant les bacilles *coli*, fluorescent non liquéfiant, *mesentericus*, *proteus vulgaris*, typhique, choléra Dantzig, nous ont permis de constater que le sérum de rat non chauffé est nettement bactéricide pour ces bactéries, alors que, chauffé à 55-56° pendant 35 minutes, il constitue un excellent milieu de culture. Le détail de ces expériences ne présentant pas d'intérêt particulier, nous nous contenterons de donner l'étude des propriétés du sérum de rat blanc vis-à-vis du bacille typhique et du choléra Dantzig.

Bacille typhique. — Nous avons étudié comparativement l'action du sérum de lapin et de rat blanc sur le bacille typhique. Les dilutions ont été pratiquées à l'aide d'une culture en bouillon âgée de 20-24 heures. Le nombre de bacilles contenus dans un anse d'ensemencement s'élevait à 70.

EXPÉRIENCE II.

NATURE du liquide de culture.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT après 24 h. des tubes de gélose inclinée, en- semencés avec une anse des tubes de la colonne 1, après un séjour de 24 h. à 37°.
Sérum rat non ch., 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — — — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 0 0
Sérum lapin non ch., 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — — — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 0 0
Sérum rat chauffé, 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — — — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	110 150 230
Sér. lapin ch. 55-56°, 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — — — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	++ ++ ++

Il ressort de cette expérience : 1° que les sérums non chauffés de rat et de lapin sont doués de propriétés nettement bactéricides vis-à-vis du bacille typhique Halle; 2° que, comparé au sérum de lapin chauffé, le sérum de rat porté pendant 35 minutes à la température de 55-56°, manifeste encore une action bactéricide, mais celle-ci est considérablement atténuée. Toutefois ces résultats ne s'obtiennent que si l'on opère avec du sérum clair et que si l'ensemencement est peu copieux.

Bacille du choléra Dantzig. — Le bacille du choléra Dantzig se prête difficilement aux expériences; pour cette bactérie en effet, le nombre de germes ensemencés et la qualité du sérum employé jouent un rôle plus important que lorsqu'il s'agit du bacille typhique Halle et surtout de la bactériémie. Alors que le nombre de germes est relativement peu élevé, 50 environ par anse, le sérum de rat chauffé à 55-56° pendant 35 minutes est dépourvu de propriétés bactéricides. Lorsque le nombre de germes ensemencés est beaucoup plus faible, 10 environ par anse, l'expérience nous apprend que le sérum de rat chauffé à 55-56° est doué de faibles propriétés bactéricides vis-à-vis du bacille du choléra Dantzig.

Conclusions : 1° le sérum de rat non chauffé est bactéricide pour des organismes autres que la bactérie charbonneuse. 2° le sérum de rat, chauffé pendant 35 minutes à la température de 55-56°, manifeste encore une action bactéricide vis-à-vis de ces mêmes organismes, mais celle-ci est considérablement atténuée.

B. *Propriétés hémolytiques du sérum de rat à l'égard des globules non sensibilisés.* — On sait que la plupart des sérums normaux sont doués de propriétés hémolysantes vis-à-vis des hématies d'espèces différentes. Après quelques essais comparatifs, nous avons constaté que les globules rouges de poule étaient particulièrement sensibles à l'action dissolvante du sérum de rat. L'expérience III a été effectuée avec le sérum de 6 rats, afin de pouvoir comparer l'action hémolytique et bactériolytique de celui-ci dans des conditions identiques.

L'étude du pouvoir hémolytique du sérum de rat vis-à-vis des globules rouges du sang de poule nous permet de constater : 1° que le sérum de rat non chauffé est fortement hémolytique pour les globules rouges de poule; 2° que le sérum de rat,

EXPÉRIENCE III.

HÉMOLYSE		
LIQUIDE employé pour l'hémolyse.	QUANTITÉ de globules ajoutés.	RÉSULTAT après 2 h. de séjour à 37°.
Sérum rat non chauffé, 20 gouttes.....	1 goutte sang.	Nette.
Sér. rat non ch., 40 g. + 10 g. eau physiol.	—	—
— — 45 g. + 15 g. —	—	—
— — 2 g. + 18 g. —	—	—
Sérum rat chauffé 56°, 20 gouttes.....	1 goutte sang.	Néant.
— — 56°, — 1/5 —	—	—
— — 56°, — 1/10 —	—	—
BACTÉRIOLYSE		
NATURE du liquideensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT après 24 h des tubes de gélose inclinés, ensemencés avec une anse des tubes de la colonne 1, après un séjour de 24 h. à 37°.
Sérum rat non chauffé, 20 g. + 2 g. bouill.	4 anse	0
— — — — —	2 anses	0
— — — — —	3 —	0
Sérum rat ch., 55-56°, 20 g. + 2 g. bouillon.	4 anse	0
— — — — —	2 anses	0
— — — — —	3 —	0
Sérum rat ch. 60-61°, 20 g. + 2 g. bouillon.	4 anse	2
— — — — —	2 anses	70
— — — — —	3 —	+
Eau physiol., 20 goutt. + 2 goutt. bouillon.	4 anse	+
— — — — —	2 anses	+
— — — — —	3 —	+
Eau physiolog. seule, 20 gouttes.....	4 anse	0
— — — — —	2 anses	0
— — — — —	3 —	0

chauffé pendant 35 minutes aux températures de 55-56° est complètement privé de ses propriétés hémolysantes.

Si nous comparons l'action hémolytique et l'action bactério-

lytique du sérum de rat, nous pourrions conclure que le sérum de rat possède une substance bactériolytique qui résiste à l'action des températures 55-56°, 60-61° et une substance hémolytique qui est détruite par l'action de ces températures.

La substance hémolytique présentant les caractères des alexines a été considérée comme telle par tous les savants. Si donc nous pouvions établir que la substance bactéricide du sérum de rat est également une alexine, nous nous trouverions en présence d'un sérum dans lequel les alexines hémolytique et bactériolytique seraient distinctes.

Propriétés du sérum de rat blanc vis-à-vis des éléments sensibilisés. Propriétés bactéricides. — La substance bactéricide du sérum de rat est une alexine. Plusieurs recherches ont été faites déjà dans le but de déterminer la nature de la substance bactéricide du sérum de rat. Les différents savants qui se sont occupés de cette question sont unanimes pour lui refuser la qualité d'alexine. Nous croyons cependant que celle-ci est une alexine, et cela pour les raisons suivantes : 1° le sérum de rat, chauffé à 56°, manifeste des propriétés bactéricides non seulement à l'égard de la bactériémie, mais aussi envers d'autres bactéries, et son action microbicide est d'intensité trop variable à l'égard des différents organismes pour qu'on puisse l'attribuer à la présence d'une substance antiseptique ; 2° nous avons antérieurement attiré l'attention sur le fait que le chauffage atténue les propriétés bactéricides du sérum de rat, et qu'on ne parvient plus alors à les mettre en évidence qu'en ensemençant des quantités moins fortes que pour le sérum non chauffé, et parfois même des doses très faibles. Le nombre de germes ensemençés joue donc un rôle considérable. Dans ces conditions, la perte de la propriété de transformer les vibrions, même sensibilisés, en granules n'est pas une réaction assez sensible pour qu'on puisse en conclure à la disparition de l'alexine dans le sérum de rat chauffé à 56°. Pour que l'étude du phénomène de Pfeiffer soit possible il faut, en effet, pouvoir opérer avec des doses relativement fortes de vibrions, et, s'il existe peu d'alexine dans le sérum, la faible quantité de granules échappe facilement à l'examen microscopique ; 3° enfin pour refuser à la substance bactéricide du sérum de rat la qualité d'alexine, il faudrait aussi qu'elle fut inapte à réactiver les sérums sensibilisés, et jusqu'ici

aucune expérience n'a été tentée dans cette voie. Pour combler cette lacune, nous avons étudié ce pouvoir réactivant vis-à-vis des sérums sensibilisés contre le vibrion cholérique.

Le sérum de rat chauffé peut réactiver le choléra-sérum. — Nous avons fait dans la cavité péritonéale d'un lapin 20 injections de bacille du choléra Dantzig. Huit jours après la dernière, nous saignons le lapin et son sérum sert à l'expérience IV.

Dans cette expérience le sérum de lapin vacciné non chauffé, I, est nettement bactéricide; le sérum du même lapin chauffé, II, de même que le sérum chauffé à 55-56° d'un lapin neuf, V, donnent une culture abondante du bacille du choléra Dantzig. Si à 10 gouttes de sérum, chauffé à 56° du lapin vacciné

EXPÉRIENCE IV.

	NATURE du liquideensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées,	DÉVELOPPEMENT ap. 24 h. des tubes de gélose ensemencés avec une anse des tubes de la colonne 1, ap. un séjour de 24 h. à 37°.
I.	Sér. lap. vacc. non ch., 20 g. + 2 g. bouillon. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 0 0
II.	Sér. lap. vacc. ch. 55-56°, 20 g. + 2 g. bouill. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	+ + +
III.	Sér. rat ch. 55-56°, 20 gout. + 2 gout. bouill. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	45 130 210
IV.	Sér. lap. vacc. ch., 10 g. + 10 g. sér. rat. ch. + 2 gouttes bouillon — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	25 50 140
V.	Sérum lapin neuf ch., 20 g. + 2 g. bouill. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	+ + +
VI.	Sér. lapin neuf ch., 10 g. + 10 g. sér. rat ch. + 2 gouttes bouillon — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	+ + +

et du lapin neuf, on ajoute 10 gouttes de sérum de rat chauffé à 55-56 pendant 35 minutes, le sérum chauffé du lapin vacciné récupère ses propriétés bactéricides, IV, alors que le sérum du lapin neuf reste favorable au développement du bacille du choléra Dantzig VI, or le sérum chauffé du lapin vacciné ne diffère du sérum chauffé du lapin neuf que parce qu'il contient la choléra-sensibilisatrice, laquelle ne peut être réactivée que par une alexine.

Le sérum du rat chauffé à 55-56 contenait donc une alexine bactériolytique.

Propriétés hémolytiques du sérum de rat chauffé vis-à-vis des hématies sensibilisées. — L'alexine qui persiste dans le sérum de rat chauffé à 55-56 est incapable de réactiver les hémosérums préalablement chauffés. Nous avons poussé dans la cavité péritonéale d'une poule 4 injections de 5 c. c. de sang de lapin défibriné et lavé. Huit jours après la dernière injection nous avons étudié les propriétés réactivantes du sérum de rat vis-à-vis des hématies de lapin sensibilisées, et nous avons constaté que le sérum de poule sensibilisé contre les globules rouges de lapin est réactivé par le sérum de rat non chauffé, tandis qu'il reste inactif si on lui ajoute le même sérum de rat préalablement chauffé pendant 35 minutes à 55-56°.

On sait qu'il existe parfois de légères différences individuelles entre le sérum des rats blancs, et que l'absence ou la présence d'hémoglobine dissoute influence considérablement le résultat.

Tant pour éliminer ces deux causes d'erreur, que pour condenser nos recherches sur les éléments sensibilisés, nous avons entrepris une dernière expérience avec le sérum clair de 8 rats blancs, que nous avons fait agir sur du cholérasérum provenant d'un lapin qui avait reçu dans le péritoine 24 injections de 2 c. c. de culture en bouillon âgée de 24 heures de choléra Dantzig, et sur de l'hémosérum fourni par un cobaye qui avait reçu 12 injections intrapéritonéales de 5 c. c. de sang défibriné et lavé.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-après.

Il résulte de cette expérience : 1° que le mélange du sérum de lapin vacciné chauffé, II (qui constitue un milieu de culture favorable au développement du bacille du choléra Dantzig), et du sérum de rat chauffé donne un liquide manifestement doué de propriétés bactéricides pour cet organisme IV. Le sérum de rat

chauffé contient donc une alexine bactériolytique qui a résisté à la température de 55-56 pendant 35 minutes; 2° que le même sérum de rat chauffé à 55-56° pendant 35 minutes est dépourvu de tout pouvoir réactivant vis-à-vis des globules rouges de poule fortement sensibilisés.

EXPÉRIENCE V

BACTÉRIOLYSE		
NATURE du liquide ensemencé.	NOMBRE d'anses ensemencées.	DÉVELOPPEMENT ap. 24 h. des tubes de gélose inclinée, ensemencés avec une anse des tubes de la col. 1, ap. 24 h. de séjour à 37°.
I. Sér. lap. vacc. non ch., 20 g. + 2 g. bouill. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 0 0
II. Sér. lapin vacciné ch., 20 g. + 2 g. bouill. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	180 + +
III. Sér. rat chauffé, 20 goutt. + 2 goutt. bouill. — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 60 250
IV. Sér. lapin vacc. ch., 10 g. + 10 g. sér. rat chauffé + 2 gouttes bouillon..... — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	0 0 19
V. Sér. lap. neuf ch., 10 g. + 10 g. sér. rat ch. + 2 gouttes bouillon..... — — — — —	1 anse 2 anses 3 —	+ + +
HÉMOLYSE		
NATURE du liquide hémolytique.	NOMBRE de gouttes de sang de lapin ajoutées.	RÉSULTAT après 2 h. à 37°.
Sérum cobaye vacciné non chauffé, 20 gouttes. — — — — — chauffé, 20 gouttes....	1 goutte 1 — 1 —	Nette Néant —
Sér. cob. vacc. chauffé, 10 g. + 10 g. sér. rat ch. — — — — —	1/10 —	—

CONCLUSIONS GÉNÉRALES :

1° Le sérum de rat non chauffé est bactéricide pour la plupart des bactéries ;

2° L'action d'une température de 55-56° pendant 35 minutes atténue sans les annihiler les propriétés bactéricides du sérum de rat vis-à-vis de la bactériémie, du bacille typhique Halle, du choléra Dantzig ;

3° La substance bactéricide qui, dans le sérum de rat, résiste à l'action de la chaleur est une alexine ;

4° L'alexine qui dans le sérum de rat résiste à l'action de la chaleur 55-56° n'est pas hémolytique, puisqu'elle est incapable de réactiver les hémosérums. En conséquence l'alexine qui dans le sérum de rat préside aux phénomènes bactériolytiques est différente de celle qui intervient dans la dissolution des globules rouges. Toutefois les expériences actuelles ne permettent pas de conclure s'il existe dans le sérum de rat une ou plusieurs alexines hémolytiques et bactériolytiques.

(Institut chimique et bactériologique de l'État, à Gembloux,

Novembre 1902.)

BIBLIOGRAPHIE

- 1) BUCHNER, *Verhand. des Congr. f. in Med. Wiesbaden*, 1892.
- 2) BORDET, ces *Annales*, 1900.
- 3) METCHNIKOFF, ces *Annales*, 1899.
- 4) EHRLICH et MORGENROTH, *Berl. Klin. Woch.*, 1899-1900-1901.
- 5) NEISSER, *Deut. Med. Woch.*, 1900.
- 6) WECHSBERG, *Wien. Klin. Woch.*, 1901.
- 8) METCHNIKOFF, ces *Annales*, 1899.
- 9) GENGOU, ces *Annales*, 1901.
- 10) TARASSEVITCH, ces *Annales*, 1902.
- 11) BORDET, ces *Annales*, 1899.
- 12) DANYSZ, ces *Annales*, 1900.
- 13) MALVOZ, ces *Annales*, 1902.
- 14) SAWTCHENKO, ces *Annales*, 1897.
- 15) BEHRING, *Centralb. f. Klin. Med.*, 1888.
- 16) METCHNIKOFF et ROUX, ces *Annales*, 1891.

Sur la non-existence des « neutrophiles » d'Ehrlich dans le sang de l'homme et du singe.

PAR F. MARINO.

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

La méthode chromatique, morphologique et histochimique a permis à Ehrlich de conclure à l'existence de trois sortes de granulations dans les leucocytes de l'homme et du singe :

1^o *Granulations éosinophiles ou oxyphiles* (α d'Ehrlich), se colorant bien par les couleurs acides ;

2^o *Granulations basophiles ou granulations métachromatiques* dans les mastzellen (γ), prenant les couleurs basiques ;

3^o *Granulations neutrophiles* (ε), n'ayant d'affinité ni pour les couleurs acides ni pour les couleurs basiques, et que seuls peuvent colorer les mélanges neutres.

Poussant plus loin ses recherches, et se basant toujours sur la classification des granulations, Ehrlich a formulé une classification des leucocytes en leucocytes *granuleux* et non *granuleux* :

Dans le 1^{er} groupe (leucocytes granuleux), Ehrlich range :

1^o Les leucocytes de transition ou formes de passage ;

2^o Les leucocytes polynucléaires neutrophiles ;

3^o Les leucocytes polynucléaires éosinophiles ;

4^o Les mastzellen.

Dans le 2^e groupe (leucocytes non granuleux) prennent place :

1^o Les lymphocytes ;

2^o Les gros leucocytes mononucléaires.

L'hématologie s'est arrêtée à ces conceptions et il est courant d'employer les termes d'*éosinophiles* et de *neutrophiles*.

Cette particularité, qu'on ne rencontrait de granulations neutrophiles que dans le sang de l'homme et du singe, et aussi l'intérêt qu'il pouvait y avoir à connaître la valeur physiologique de ces granulations nous ont décidé à faire de nouvelles recherches.

Tout d'abord une question se pose :

L'affinité neutrophile est-elle une propriété absolue de certaines granulations, ou bien simplement une qualité mise en relief par certains modes de fixation, que l'on doit employer pour colorer les neutrophiles ?

Rappelons, en passant, que, par couleur neutre, on désigne la matière colorante qui résulte du mélange d'une couleur acide et d'une couleur basique.

Quant au « triacide »¹ Ehrlich désigne sous ce nom une couleur neutre qu'il juge indispensable dans la coloration des granulations neutrophiles.

Voici, d'ailleurs, en quels termes il² s'exprime à ce sujet :

La coloration par le triacide constitue une technique très commode. Elle est très recommandable quand on veut avoir des préparations d'ensemble; elle est indispensable (unentbehrlich) dans tous les cas où nous avons affaire à des granulations neutrophiles.

Et plus loin³, parlant, à propos des leucocytes polynucléaires, de granulations neutrophiles, il dit :

Le noyau se colore fortement par tout colorant nucléaire; le protoplasma possède une affinité très vive pour la plupart des substances colorantes acides, et il est caractérisé, sans aucun doute (unverkennbar) par la présence d'une grande quantité de granulations neutrophiles.

Ehrlich rencontre ces mêmes granulations dans le protoplasma des gros mononucléaires, des myélocytes et des petits pseudolymphocytes neutrophiles⁴.

Donc, pour lui, ces granulations très petites, des leucocytes de l'homme et du singe, se colorent exclusivement par les mélanges neutres, d'où le nom de *granulations neutrophiles* et celui de *leucocytes mono et polynucléaires*, de *myélocytes* et de *petits*

1. La composition du triacide est la suivante :

Solution saturée d'orange G.	13 c. c.
— — — — — de fuchsine acide.....	6 —
Eau distillée.....	15 —
Alcool.....	15 —
Solution saturée de vert de méthyle	12 —
Alcool.....	10 —
Glycérine.....	10 —

2. EHRLICH und LAZARUS. *Anaemie, in Nothnagel Specielle Pathologie und Therapie*, p. 29.

3. *Idem*, p. 50.

4. *Id.*, p. 52.

pseudolymphocytes neutrophiles, donnés aux globules blancs qui les contiennent.

Nous avons répété les expériences de M. Ehrlich, et nous avons remarqué, en effet, qu'en suivant la technique qu'il indique, — fixation à 110° pendant 15-20 minutes, — on colore à l'aide du triacide les certaines granulations dites *neutrophiles*; mais nous avons vu aussi qu'en modifiant cette technique, le triacide, loin d'être indispensable, est inutile et peut être remplacé par des couleurs acides.

Voici notre procédé : on met sur une lamelle très propre une goutte de sang que l'on étale en faisant glisser sur elle une autre lamelle. Le sang est immédiatement coloré, soit par une solution aqueuse de fuchsine acide à 10 0/0, soit par une solution faible 1 0 0, soit enfin par une solution aqueuse d'éosine, 1/100, 1/1000, 1/10,000, 1/50,000, et quelquefois même par des solutions beaucoup plus faibles. D'ordinaire on fait agir ces solutions 1 à 5 minutes, ensuite on lave les préparations et, après les avoir séchées, on les monte au baume. On voit ainsi, très nettement, les granulations décrites jusqu'à présent comme granulations neutrophiles.

On obtient les mêmes résultats en faisant agir les solutions colorantes sur le sang séché à l'air, pendant 1-2-3 heures, 5-10-20 jours, ou bien sur le sang fixé 10 fois à la flamme, ou à 110°.

Nous ferons remarquer, à propos de la coloration du sang à l'état frais ou séché à l'air, que la solution aqueuse forte ou diluée de fuchsine colore, en même temps que les granulations, les globules rouges; l'éosine, au contraire, en solution aqueuse saturée ou même étendue, n'empêche pas le laquage du sang.

L'avantage de l'éosine sur la fuchsine consiste dans son action colorante sur les granulations, même quand elle est employée en solutions très faibles (1/50,000).

Il nous semblait, après ces premiers essais, que nous étions à même de conclure que la fixation par la chaleur modifiait l'affinité acidophile, en la rendant neutrophile.

Pour contrôler cette manière de voir, nous avons essayé de colorer des préparations du sang préalablement fixées à la chaleur (10 fois à la flamme ou à 110°).

Nous nous sommes aperçu que, dans ces conditions, les granulations des neutrophiles se coloraient encore.

L'opinion de M. Ehrlich sur leur compte nous semblait donc erronée et l'interprétation que nous donnions de notre première expérience était également fausse.

Fixées à la chaleur ou non fixées, les granulations leucocytaires, à l'exception des granulations basophiles, se montraient toutes acidophiles.

Voici les conclusions qui découlent de nos dernières recherches :

1° Il nous paraît évident aujourd'hui que les neutrophiles n'existent pas ;

2° Le triacide, vis-à-vis de granulations des prétendus neutrophiles, ne se montre pas une couleur neutre.

Peut-être la basicité du vert de méthyle est-elle insuffisante pour saturer l'acidité des deux couleurs acides avec lesquelles on fait le mélange, et alors le triacide, par les groupements oxhydrides des deux dernières (orange et fuchsine) agit, vis-à-vis des granulations, comme une couleur purement acide.

Mais, même en admettant que le triacide soit une couleur neutre idéale, on peut très bien admettre que certaines granulations des globules blancs, refusant les autres couleurs du mélange, se laissent colorer seulement par la fuchsine — phénomène très commun dans les procédés de teinture.

*
* *

Après avoir démontré que les granulations des polynucléaires de l'homme et du singe étaient acidophiles, nous avons entrepris une autre série de recherches, pour voir si elles étaient aussi basophiles.

Grâce au même procédé, nous les avons colorées très facilement, en faisant agir, 15-20 minutes, 1-2 heures, sur des préparations de sang fixé et non fixé, une solution aqueuse saturée ou diluée (1/100; 1/1,000; 1/10,000) de bleu de méthylène. Il faut noter que si le bleu n'est pas de bonne qualité, les granulations restent incolores.

De cette façon nous nous sommes convaincu que les granulations décrites par Ehrlich comme *neutrophiles* sont de véritables granulations *amphophiles*, c'est-à-dire des granulations colora-

bles soit par des couleurs acides, soit par des couleurs basiques. Il en est de même pour les granulations des éosinophiles.

Étant donnée la nature de ces granulations, nous trouvons que l'ancienne division en *éosinophiles* et *neutrophiles*, adoptée par Ehrlich et par tous les hématologistes qui l'ont suivi, est impropre, et pour cette raison nous proposons de substituer aux noms de *leucocytes éosinophile* et *neutrophile*, ceux de *leucocytes macro* et *microgranuleux*, et aux noms d'*éosinophilie* et *neutrophilie*, ceux de *macrogranulie* et *microgranulie*.

D'après cette classification, il est naturel de ne pas se servir des dénominations de « *mononucléaires* et de *myélocytes éosinophiles* et *neutrophiles* », mais d'adopter les termes de « *mononucléaires* et *myélocytes macro* et *microgranuleux* ».

* * *

Ayant démontré que le triacide est inutile pour colorer les granulations des éosinophiles et des neutrophiles, et, d'autre part, étant donné que le procédé de coloration avec ce colorant est long et souvent ne donne pas de bons résultats, nous avons essayé de le remplacer par d'autres substances qui colorent rapidement tous les éléments figurés du sang, les microbes, et — sans les différencier — les hématozoaires.

Dans cette nouvelle coloration, nous avons tâché de réunir trois avantages :

1° Rapidité de la fixation, passage 10 fois à la flamme ou fixation à 110° pendant 5 à 6 minutes;

2° Rapidité de la coloration avec une couleur acide — (fuchsine);

3° Rapidité de la coloration avec une couleur basique, — brillant-kresylblau — en dilution telle qu'elle ne puisse neutraliser la couleur acide, tout en pouvant colorer tous les éléments basophiles.

Voici les détails de notre méthode :

On met 1 goutte de sang sur une lamelle bien propre, on l'étend par glissement d'une autre lamelle, on sèche et on passe 10 fois à la flamme du bec Bunsen, en mettant la lamelle sur une lame pour ne pas brûler le sang. La lamelle est tenue sur la lame à l'aide d'une pince. On fait agir la solution aqueuse à 10 0/0 de fuchsine — versée dans un verre de montre —

15 à 20 secondes et quelquefois 2 à 3 minutes), on lave à l'eau, on sèche avec du papier buvard et on fait agir ensuite le brillant — versé aussi dans un verre de montre — de 25 à 30 secondes; — on lave à l'eau, on sèche et on monte au baume.

On peut employer indifféremment soit une solution aqueuse à 1/5,000, soit une solution alcoolique à 1/200 d'alcool absolu. Nous préférons la première qui donne des préparations plus claires.

Au lieu de la solution aqueuse de brillant, on peut se servir aussi d'une solution 1/10,000 d'azur (Nocht), que l'on fait agir 5 secondes. Enfin, on peut se servir de n'importe quelle substance basique (bleu, vert de méthyle), pourvu qu'elles soient très diluées (1/2,000, 1/4,000 d'eau) et agissent très peu de temps 20 à 30 secondes.

Lorsqu'on prolonge pendant 20 à 30 minutes la coloration, par le brillant, de préparations ayant subi préalablement une forte coloration par la fuchsine, on obtient aussi de très belles colorations doubles, dans lesquelles la teinte bleue prédomine.

Les résultats sont supérieurs à ceux que donne, plus laborieusement, d'ailleurs, le triacide d'Ehrlich.

Au lieu de faire la coloration du sang en deux temps, on peut encore se servir du mélange de fuchsine acide et de brillant dans les proportions suivantes :

Fuchsine acide (10 p. 100).....	4 c. c.
Brillant (solution aqueuse à 1 p. 100).....	5 —

Il faut préparer ce mélange 3-4 heures avant de s'en servir et le faire agir 5-10 minutes.

Le procédé est applicable au sang, quelle que soit l'espèce animale, supérieure ou inférieure (V. *fig. 1, go*), granulations d'*Holothuria tubulosa*) aux coupes, aux exsudats, aux frottis, ou préparations par contact (rate, ganglions, moelle des os, et autres organes.)

*
* * *

Après avoir démontré qu'on peut colorer les granulations des prétendus neutrophiles, soit avec les couleurs acides, soit avec les couleurs basiques, nous nous sommes demandé quelle est la nature chimique intime de cette variété de granulations. La réponse n'est pas facile. On peut penser que ces granulations sont peut-être constituées par des groupements moléculaires de

nature acide et par des groupements moléculaires de nature basique. Les premiers, s'ils existaient, auraient de l'affinité pour les couleurs (basiques basophiles) et les seconds auraient de l'affinité pour les couleurs acides, (acidophiles). On peut admettre l'existence de ces deux espèces de groupements, sans préciser davantage leurs relations numériques.

Au moment de rédiger notre mémoire, nous venons de parcourir un livre de C. Levaditi¹ (Bucarest), avec préface de P. Ehrlich.

A la page 42, nous lisons: « *Les granulations neutrophiles ont de particulier que fixées par la chaleur (110°) elles ne se colorent ni avec les pigments basiques ni avec les couleurs acides. Néanmoins, Marino affirme que les granulations renfermées dans les polynucléaires de l'homme retiennent, DANS CERTAINES CONDITIONS DE FIXATION, soit les pigments acides, soit les couleurs basiques, et que par conséquent la propriété dite neutrophilie n'est pas réelle. Il y a lieu pourtant de remarquer que Marino emploie comme moyen de fixation non pas le chauffage à 110°, tel qu'il a servi à Ehrlich pour établir le caractère distinctif de ces granulations neutrophiles, mais une courte élévation de température.* » Donc, d'après Ehrlich, pour établir le caractère distinctif, ou, pour mieux dire, la nature chimique d'un élément cellulaire, il faut le fixer à 110°.

Les résultats de nos recherches nous empêchent de partager ces idées.

D'ailleurs nous n'avons jamais dit ni écrit que les granulations renfermées dans les polynucléaires de l'homme retenaient, DANS CERTAINES CONDITIONS DE FIXATIONS, SOIT LES PIGMENTS ACIDES, SOIT LES COULEURS BASIQUES; mais nous avons dit et répété que « LES GRANULATIONS DÉCRITES PAR EHRlich COMME NEUTROPHILES RETENAIENT TOUJOURS LES COULEURS DÉCRITES PAR ET LES COULEURS BASIQUES, SOIT COLORÉES A L'ÉTAT FRAIS, SOIT SÉCHÉES A L'AIR, SOIT FIXÉES 10 FOIS A LA FLAMME, SOIT FIXÉES À 110° ».

Nous remercions vivement notre illustre maître M. Metchnikoff de l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à nos recherches.

Paris, 6 novembre 1902.

1. C. LEVADITI, *Le Leucocyte et ses granulations*. C. Naud, éditeur, 1902.

EXPLICATION DE LA PLANCHE VII

FIG. 1. — Sang d'homme à l'état frais. Coloration à l'éosine, 1/10,000. (Leitz 1/16. Imm. homog. oc. 3) : *ma*, *ma*, amphophiles macrogranuleux (éosinophiles suivant l'ancien langage d'Ehrlich); *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux (neutrophiles, suivant l'ancien langage d'Ehrlich); *go*, granulations d'un leucocyte d'*Holothuria tubulosa*.

FIG. 2. — Le même sang à l'état frais. Coloration au bleu de méthylène, 1/100 : *r*, globule rouge; *ma*, *ma*, amphophiles macrogranuleux; *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux; *mo*, mononucléaire; *ly*, lymphocyte; *mas*, mastzellen.

FIG. 3. — Sang normal. Fixation 10 fois à la flamme; coloration de fuchsine et de brillant : *r*, globule rouge; *ma*, amphophile macrogranuleux; *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux; *mo*, mononucléaire.

FIG. 4. — Sang de lapin. Fixation 10 fois à la flamme; coloration à la fuchsine acide et au brillantcresylblau : *r*, globule rouge; *ma*, amphophile macrogranuleux; *mi*, *mi*, amphophiles microgranuleux; *mo*, mononucléaire; *ly*, lymphocyte; *b*, bactérie charbonneuse.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1902

PAR M. EUGÈNE VIALA

Préparateur au service antirabique.

I

Pendant l'année 1902, 1,106 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 3 sont mortes de la rage ; chez une d'entre elles, la rage s'est déclarée avant la fin du traitement ; cette personne ne sera pas comptée parmi les traitées.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées.....	1.105
Morts.....	2
Mortalité 0/0.....	0,18

Dans le tableau suivant, ces chiffres sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité 0/0.
1886.	2.671	25	0,94
1887.	1.770	14	0,79
1888.	1.622	9	0,55
1889.	1.830	7	0,38
1890.	1.540	5	0,32
1891.	1.559	4	0,25
1892.	1.790	4	0,22
1893.	1.648	6	0,36
1894.	1.387	7	0,50
1895.	1.520	5	0,33
1896.	1.308	4	0,30
1897.	1.521	6	0,39
1898.	1.465	3	0,20
1899.	1.614	4	0,25
1900.	1.420	4	0,35
1901.	1.321	5	0,38
1902.	1.105	2	0,18

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1902.

	MORSURES à la tête.			MORSURES aux mains.			MORSURES aux membres.			TOTAUX		
	Traités	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.
Tableau A.	20	0	0	87	2	2,30	43	0	0	150	2	1,33
Tableau B.	51	0	0	405	0	0	169	0	0	625	0	0
Tableau C.	21	0	0	190	0	0	119	0	0	330	0	0
	92	0	0	682	2	0,29	331	0	0	1.105	2	0,18

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,105 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre.....	9
Espagne.....	2
Grèce.....	1
Hollande.....	1
Russie.....	2
Suisse.....	1

Soit 16 étrangers et 1,089 Français.

Voici la répartition par départements des 1,089 Français.

Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que cinq Instituts antirabiques fonctionnent aujourd'hui qui n'existaient pas autrefois. Lille, Marseille, Montpellier, Lyon et Bordeaux drainent les mordus des régions environnantes.

Aisne.....	13	Gers.....	6	Oise.....	10
Allier.....	17	Ille-et-Vilaine.....	24	Orne.....	15
Alger.....	1	Isère.....	1	Puy-de-Dôme.....	15
Alpes-Maritimes....	1	Indre.....	14	Pyrénées (Hautes-).	3
Ardèche.....	1	Indre-et-Loire.....	16	Saône-et-Loire.....	3
Aveyron.....	4	Jura.....	12	Saône (Haute-).	8
Cantal.....	40	Landes.....	4	Savoie.....	3
Calvados.....	25	Loire (Haute-).	2	Savoie (Haute-).	1
Cher.....	6	Loire-Inférieure.....	23	Sèvres (Deux-).	20
Charente.....	9	Loiret.....	4	Seine-et-Marne.....	5
Charente-Inférieure	7	Loir-et-Cher.....	4	Seine-Inférieure.....	10
Côte-d'Or.....	6	Lot.....	24	Seine-et-Oise.....	73
Côtes-du-Nord.....	36	Lot-et-Garonne.....	3	Seine.....	386
Corrèze.....	26	Lozère.....	1	Somme.....	14
Creuse.....	25	Maine-et-Loire.....	31	Tarn.....	4
Dordogne.....	14	Manche.....	18	Tarn-et-Garonne...	5
Doubs.....	2	Marne.....	6	Vendée.....	10
Eure.....	3	Mayenne.....	8	Vienne.....	4
Eure-et-Loir.....	7	Meurthe-et-Moselle.	3	Vienne (Haute-).	19
Finistère.....	18	Meuse.....	2	Vosges.....	1
Gard.....	1	Morbihan.....	7	Yonne.....	1
Garonne (Haute-)...	4	Nièvre.....	1		

PERSONNES PRISES DE RAGE EN COURS DE TRAITEMENT.

BAYOLS, Rosa, 2 ans, demeurant chez son père à Grazac (Tarn). Mordue le 23 juin, au front, plaie pénétrante oblique de 10 centimètres; paupière supérieure de l'œil gauche, une plaie pénétrante suppure, conjonctivite. Ces plaies n'ont pas été cautérisées.

Mordue par un chien reconnu enragé un vétérinaire de la localité.

La jeune Bayols a commencé le traitement le 24 juin, a été prise de rage le 7 juillet. Morte à l'hôpital Pasteur le 9 juillet.

PERSONNES TRAITÉES, MORTES DE RAGE APRÈS LE TRAITEMENT.

M^{me} DENECHAU, née Leroyer, 63 ans, demeurant à Angers. Mordue le 30 juillet, main gauche face dorsale 3 morsures profondes, main droite 4 autres morsures profondes, coude droit 3 morsures pénétrantes, cuisse droite 4 morsures pénétrantes. En tout 14 morsures profondes qui ont saigné et qui ont été lavées seulement au phénol.

Mordue par un chien reconnu suspect de rage par M. Dousart, vétérinaire à Angers. Un cobaye, inoculé avec le bulbe de ce chien le 31 juillet, a été pris de rage le 27 décembre.

M^{me} Denéchau a été traitée à l'Institut Pasteur du 1^{er} au 20 août; les symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 30 octobre, morte le 2 novembre.

Sept autres personnes mordues gravement par le même chien et traitées à l'Institut Pasteur se portent bien.

PIRCE, Jean-Baptiste, 51 ans, coiffeur, rue Muller, 24, à Paris. Mordu le 2 octobre. Index droit, 3 morsures pénétrantes ; pouce droit, 1 morsure pénétrante. Ces plaies qui ont saigné ont été lavées seulement à l'eau.

Mordu par un chien qui a été reconnu enragé par un vétérinaire.

Pirce ne s'est présenté à l'Institut Pasteur que le 11 octobre. Traité du 11 au 28 octobre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 8 février 1903. Mort à l'hôpital Pasteur le 9 février.

Pirce était alcoolique.

RECTIFICATION A LA STATISTIQUE DE L'ANNÉE 1900.

BOWEN Thomas, 61 ans, charpentier, demeurant à Glan-Garnant, Galles du Sud, Angleterre. Mordu le 7 août, index et médius gauche, 5 plaies pénétrantes, par un chien reconnu enragé par M. Howell-Ress : les plaies ont été cautérisées au nitrate d'argent.

Bowen a été traité du 31 août au 17 septembre 1900. Mort de rage le 28 mai 1902.

En tenant compte du cas de Bowen, il faut rectifier la statistique de 1900 de la façon suivante :

Personnes traitées.....	1,413
Morts.....	5
Mortalité.....	0,35

et le tableau B, morsures aux mains, devient : 555 traités ; morts 1.